

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-365493

(43) 公開日 平成4年(1992)12月17日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 1 2 P 13/14		A 6977-4B		
// (C 1 2 P 13/14				
C 1 2 R 1:15)				
(C 1 2 P 13/14				
C 1 2 R 1:13)				

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平3-178450	(71) 出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)7月18日	(72) 発明者	村上 豊 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平2-239295	(72) 発明者	河原 義雄 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(32) 優先日	平2(1990)9月10日	(72) 発明者	今泉 紘一 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 発酵法によるL-グルタミン酸の製造法

(57) 【要約】

【目的】 発酵法によりL-グルタミン酸を工業的にさらに安価に製造する方法を提供する。

【構成】 プレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属し、L-グルタミン酸生産能を有しかつ細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株を、培地中で培養して培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属し、L-グルタミン酸生産能を有しかつ細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株を、培地中で培養して培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

【請求項2】 培地の浸透圧が2,000ないし4,000mOsm/kg・H<sub>2</sub>Oである請求項1記載のL-グルタミン酸の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は発酵法によるL-グルタミン酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来よりL-グルタミン酸はプレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属する微生物を用いた発酵法により工業的に生産されている。

【0003】 従来のL-グルタミン酸発酵においては、発酵原料となる糖を高濃度仕込んだ場合や、発酵の後期において、L-グルタミン酸の生産性が低下するという問題があった。本発明者らの研究によれば、この生産性の低下は培地に含まれている高濃度の糖類や塩類による高浸透圧に起因している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は発酵法によりL-グルタミン酸を工業的にさらに安価に製造する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、従来の発酵法によるL-グルタミン酸の製造法を改良すべく鋭意研究した結果、プレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属のL-グルタミン酸生産菌より細胞壁阻害剤として知られている各種抗生物質に耐性を有する株を変異誘導したところ、これらの変異株が通常の培地及び高浸透圧の培地のいずれにおいても高収率でL-グルタミン酸を生産することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0006】 すなわち、本発明はプレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属し、L-グルタミン酸生産能を有しかつ細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株を、通常の培地あるいは浸透圧が2,000ないし4,000mOsm/kg・H<sub>2</sub>Oの培地中で培養して培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法を提供するものである。

【0007】 本発明に使用する変異株の例としては、プレバクテリウム属又はコリネバクテリウムに属し、L-グルタミン酸生産能を有しかつ細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株であればいずれも

いることができる。細胞壁合成阻害作用のある抗生物質としては、バンコマイシン、バシトラシン、エンラマイシン、グアラディマイシン、ホスホマイシン等があるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0008】 本変異株は、プレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属のL-グルタミン酸生産菌を親株として誘導することによって得られる。なお、親株は、プレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属し、L-グルタミン酸生産能を有するものであれば特に限定されない。

10

【0009】 変異株の具体例として、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムではバンコマイシン耐性株AJ12557 (FERM P-11703)、バシトラシン耐性株AJ12558 (FERM P-11704)、ホスホマイシン耐性株AJ12556 (FERM P-11702)、コリネバクテリウム・グルタミカムでは、バンコマイシン耐性株AJ12560 (FERM P-11706)、バシトラシン耐性株AJ12561 (FERM P-11707)、ホスホマイシン耐性株AJ12559 (FERM P-11705) などがある。

【0010】 これらの菌株は、例えばL-グルタミン酸生産菌プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869又はコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032を紫外線照射、X線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法により変異することにより得られる。例えば250μg/mlのN-ニトロ-N'-メチル-N-ニトロソグアニジンにより30℃で20分間処理する方法等がある。

30

【0011】 変異処理した菌株から本発明の変異株を分離する方法は、親株が生育出来ない濃度の細胞壁合成阻害作用のある抗生物質を含む固体培地中あるいは液体培地中に生育できるような変異株を採取することにより行われる。

【0012】 以下に変異株の取得方法の具体例を示す。

【0013】 プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる通常の変異処理(250μg/ml、30℃、20分)を行った後、親株の生育出来ない濃度、例えば30μg/mlのバシトラシン等の抗生物質を含む最少培地(グルコース5g/l、尿素1.5g/l、硫酸アンモニウム3g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/l、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g/l、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1g/l、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.001g/l、サイアミン塩酸塩100μg/l、ビオチン30μg/l、寒天20g/l、pH7.0)に変異処理した菌液を塗布する。30℃で2~14日培養し、生育してくるコロニーを採取することにより、親株よりL-グルタミン酸生産能が向上した変異株を分離することができる。

50

【0014】 得られた変異株を用いてL-グルタミン酸

を生成蓄積させるには、通常のL-グルタミン酸発酵の培養方法を用いて行えばよい。

【0015】すなわち、使用する培地としては、通常の炭素源、窒素源、無機イオンその他の栄養素を含有する通常の培地が用いられる。炭素源として例えばサトウキビ甜菜からの糖汁あるいは蔗糖蜜、澱粉加水分解物等の糖質原料等または酢酸等の有機酸等を用いる。窒素源としては通常のL-グルタミン酸発酵に用いられるアンモニウム塩・アンモニア水、尿素等が用いられ、その他リン酸イオン、マグネシウムイオン等の無機イオンが必要に応じて適宜使用される。又ビオチンに関してもビオチン又はビオチン活性物質が生育の適量以下の制限条件において培養を行うか、または蔗糖蜜等のビオチン過剰原料を炭素源として使用するときにはペニシリンG、F、K、O、V、X等のペニシリン類あるいはシュークロースモノバルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノバルミテート等の高級脂肪酸又はその誘導体よりなる界面活性剤をビオチン抑制物質として添加する等の方法で培養が行われる。なおL-グルタミン酸発酵における通常の培地の浸透圧は2,000mOsm/kg・H<sub>2</sub>O未満であるが(糖濃度150g/l未満)、本発明で使用する変異株は浸透圧が2,000ないし4,000mOsm/kg・H<sub>2</sub>Oの培地でのL-グルタミン酸発酵\*

\* (糖濃度150ないし320g/l)にも適用できる。

【0016】培養条件についても温度30~40℃、pH6~8.5の範囲内で好気的条件下で培養する等常法によって実施する。

【0017】培養液よりL-グルタミン酸を採取する方法は晶析等の通常の方法で行う。

【0018】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

#### 10 【0019】実施例1

グルコース50g/l、尿素4g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1g/l、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O0.4g/l、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O10mg/l、MnSO<sub>4</sub>・nH<sub>2</sub>O10mg/l、サイアミン塩酸塩200μg/l、ビオチン300μg/l、大豆蛋白加水分解物0.9g/l(全窒素として)を含む種母培地をpH7.0に調製し、その50mlずつを500ml容肩付フラスコに入れ加熱殺菌した。これに表1に示す細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株またはその親株を接種し31.5℃に保ちつつ15時間振盪培養した(これを種母培養液という)。

【表1】

菌 株	菌株に付与した耐性薬剤名	L-グルタミン酸濃度(g/dl)	対糖収率(%)
ATCC13869	—	2.65	49.1
AJ12557 (PERM P-11703)	バンコマイシン	2.85	52.8
AJ12558 (PERM P-11704)	バシトラシン	2.90	53.7
AJ12556 (PERM P-11702)	ネオホマイシン	2.78	51.5
ATCC13032	—	2.62	48.5
AJ12560 (PERM P-11706)	バンコマイシン	2.78	51.5
AJ12561 (PERM P-11707)	バシトラシン	2.87	53.1
AJ12559 (PERM P-11705)	ネオホマイシン	2.75	50.9

【0020】次に、蔗糖蜜(グルコース換算)60g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1g/l、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O1g/l、サイアミン塩酸塩100μg/lの組成の培地を別に調製し(pH7.0)、その20mlずつを500ml振盪フラスコに分注し115℃で10分加熱殺菌した。なお、この培地はL-グルタミン酸発酵における通常の培地であり、その浸透圧は1400mOsm/kg・H<sub>2</sub>Oである。これらの培地に上記の種母培養液を張込み量の10%相当接種し、往復振盪機により31.5℃で培養を行った。

【0021】培養中、培養液をpH6.0~8.5に保つように450mg/mlの濃度の尿素溶液を少量ずつ添加した。培養液の26倍希釈液が562mμの吸光度で0.30に到達した時にポリオキシエチレンソルビタンモノバルミテート(PESP)を添加した。36時間で発酵を終了し、発酵液中に蓄積したL-グルタミン酸の対糖収率を測定した。

【0022】その結果、表1に示すように、細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株は、いずれも親株に比べてL-グルタミン酸を良好に蓄積した。

#### 【0023】実施例2

蔗糖蜜(グルコース換算)150g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1g/l、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O1g/l、サイアミン塩酸塩100μg/l、消泡剤0.02ml/l、ソルビトール50g/lの組成の培地を調製し(pH7.0)、11容ジャーファーマンターに300mlずつ張込み120℃で10分加熱殺菌した。なお、この培地はL-グルタミン酸発酵における通常の培地より高浸透圧の培地であり、その浸透圧は2600mOsm/kg・H<sub>2</sub>Oである。

【0024】これらの培地に実施例1の菌株の種母培養液を張込み量の8%相当を接種し31.5℃で通気攪拌培養を行った。培養中アンモニアガスをファーマンターに通し培養液をpH7.8に調製した。培養液の26倍希

积液が562mμの吸光度で0.35に到達した時にPESPを添加した。24時間で発酵を終了し、発酵液中に蓄積したL-グルタミン酸の対糖収率を測定した。

【0025】その結果、表2に示すように、高浸透圧の\*

\*培地においても、細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株は、いずれも親株に比べてL-グルタミン酸を良好に蓄積した。

【表2】

菌 株	菌株に付与した 耐性薬剤名	L-グルタミン酸 対糖収率 (%)
プレバ <sup>®</sup> ・ラクトファーマンタム ATCC 13869	—	47.0
AJ12557 (FERM P-11703)	バンコマイシン	51.0
AJ12558 (FERM P-11704)	バシトラシン	52.2
AJ12556 (FERM P-11702)	ホスホマイシン	49.8
コリネバ <sup>®</sup> ・ラクトファーマンタム ATCC 13032	—	45.6
AJ12560 (FERM P-11706)	バンコマイシン	50.1
AJ12561 (FERM P-11707)	バシトラシン	51.5
AJ12559 (FERM P-11705)	ホスホマイシン	48.7

【0026】実施例3

表3に示す濃度（グルコース換算）の蔗糖蜜、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/l、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1g/l、サイアミン塩酸塩100μg/l、消泡剤0.02ml/lの組※

※成の培地を調製し（pH7.0）、11容ジャーフェーマンターに300mlずつ張込み120℃で10分加熱殺菌した。

【表3】

糖 濃 度 (g/l)	浸 透 圧 (mOsm/kg・H <sub>2</sub> O)	L-グルタミン酸対糖収率 (%)	
		ATCC13869	AJ12558
140	1800	50.0	54.2
150	2000	46.0	52.5
200	2600	45.0	51.5
250	3200	35.5	50.3
320	4000	30.0	42.0
400	5000	15.2	16.2

【0027】これらの培地にバシトラシン耐性のプレバ<sup>®</sup>・ラクトファーマンタムAJ12558またはその親株ATCC13869の種母培養液を張込み量の8%相当を接種し31.5℃で通気攪拌培養を行った。培養中アンモニアガスをフェーマンターに通し培養液をpH7.8に調整した。培養液の26倍希釈液が562mμの吸光度で0.35に到達した時にPESPを添加した。30時間で発酵を終了し、発酵液中に蓄積したL-グルタミン酸の対糖収率を測定した。

【0028】その結果、表3に示すように、培地の浸透

圧（アドバンス社製浸透圧計3W2型により測定）が2000ないし4000mOsm/kg・H<sub>2</sub>Oという高いレベルにおいても、細胞壁合成阻害作用のある抗生物質に耐性を有する変異株は、親株に比べてL-グルタミン酸を良好に蓄積した。

【0029】

【発明の効果】本発明のL-グルタミン酸の製造法によれば、従来の方法よりさらに安価にL-グルタミン酸を工業生産することができる。